



2019 10 al 13 de septiembre - Cartagena de Indias, Colombia

RETOS EN LA FORMACIÓN DE INGENIEROS EN LA ERA DIGITAL

SEPARACIÓN Y CONTEO DE FIBRAS MUSCULARES EN IMÁGENES

Manuel Guillermo Forero Vargas, Diego Alejandro Urrego Gamboa, Jorge Danilo Español Díaz

**Universidad de Ibagué
Ibagué, Colombia**

Resumen

Una de las mayores dificultades que se presenta en el estudio de medicamentos en tejidos musculares es la detección de células regenerativas y degenerativas en imágenes de microscopía. Esta tarea se hace manualmente, por lo cual es costosa en tiempo, tediosa y subjetiva. Por esta razón, en este trabajo se plantea el desarrollo de una técnica semiautomática basada en procesamiento de imágenes que permite acelerar el proceso de conteo celular, reduciendo la intervención del usuario. Igualmente, se describe una herramienta desarrollada, la cual incluye un menú que permite al usuario editar los resultados obtenidos.

Palabras clave: músculo esquelético; análisis de microscopía; detección de células; fibrosis; infiltración celular; regeneración; degeneración

Abstract

One of the greatest difficulties in the study of drugs in muscle tissues is the detection of regenerative and degenerative cells in microscopic images. This task is done manually, so it is time consuming, tedious and subjective. For this reason, in this work we propose the development of a semi-automatic technique based on image processing that accelerates the process of cell count, reducing user intervention. Likewise, a developed tool is described, which includes a menu that allows the user to edit the results obtained.

Keywords: *skeletal muscle; microscopy analysis; cell detection; fibrosis; cell infiltration; regeneration; degeneration*

1 Introducción

El estudio de medicamentos para combatir algunos tipos de enfermedades musculares se realiza a través del conteo y análisis de células en imágenes de microscopía de fibras musculares. Sin embargo, esta es una tarea larga, tediosa y difícil debido a que la membrana celular no es siempre distinguible y en algunos casos, solamente es posible determinar cuántas células se tiene por el número de núcleos celulares que se observan dentro de una región. El análisis de una sola imagen puede tomarle a un experto hasta tres horas, puesto que se debe delinear cada una de las células a mano. El procesamiento digital de imágenes ha sido usado exitosamente en diferentes campos de la ciencia, incluida la microscopía celular, para ayudar en la labor de los expertos. Por esta razón, en este trabajo se plantea un programa semiautomático en desarrollo que facilita la labor del experto.

Estudio inicial y obtención de las imágenes

Las células musculares tienen forma alargada y conforman el músculo esquelético o liso, dependiendo de la presencia de una disposición de proteínas miofibrilares que se repiten de forma regular en los miofilamentos. El estudio de este tipo de músculo se realiza sobre tejidos extirpados de ratas Wistar. Una vez que los músculos son extraídos, se obtienen imágenes de estos tejidos, tal como se ilustra en la figura 1, para determinar la estructura y composición del tipo de fibra siguiendo un protocolo llamado H&E, por las iniciales de los dos compuestos químicos empleados, la hematoxilina y la eosina. Este proceso se realiza con el fin de realzar las células y sus núcleos, permitiendo también observar si una célula se está regenerando o degenerando.

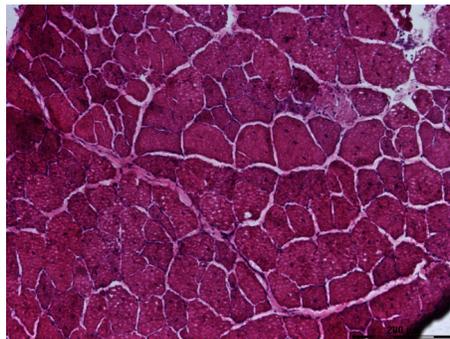


Figura 1 Imagen de microscopía de fibras musculares.

El estudio de las imágenes permite determinar factores morfológicos como el diámetro de las miofibras, en regeneración o degeneración, adipocitos y células fibróticas. El proceso de obtención de los tejidos es bastante delicado y debe procederse con cuidado, en las etapas de elaboración de las muestras, que van desde la disección hasta la conservación y manejo, para no arruinar las fibras de cualquiera de los cuatro músculos empleados en este tipo de estudio. Una vez se obtienen las muestras, éstas son estudiadas manualmente. Para ello, se establece un grosor de los trazos, del orden de μm , y se delinea cada una de las células que se consideren válidas para estudio, obteniendo como resultado una imagen como la que se muestra en la figura 2.

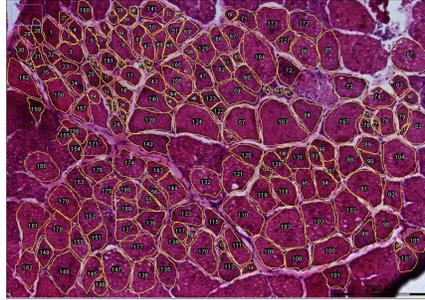


Figura 2. Imagen evaluada a mano.

Materiales

Para esta investigación se emplearon 27 imágenes, adquiridas con un microscopio Leica, de microscopia celular de tejidos musculares de rata Wistar adulta, teñidos con hematoxilina y eosina, provenientes de tres regiones de las extremidades inferiores de ratas: músculo tibial anterior, soleo y exterior digitorium longus proporcionadas por el Laboratorio de células madre del Departamento de Patología y Trasplante de la Università degli Studi di Milano, Unit of Neurology, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Centro Dino Ferrari de Milán, Italia.

Para el desarrollo de la aplicación se empleó un computador Lenovo Z40 con 8 GB de memoria RAM, procesador Intel Core i7-4720HQ Xeon processor (R) CPU E5-2650v4 @ 2.20GHz x 24, tarjeta gráfica NVIDIA Quadro P600, corriendo sobre la plataforma Windows 8. El método fue implementado en Java como un plugin del software de libre acceso ImageJ.

Desarrollo

Como puede observarse en la figura 1, la tinción no es uniforme. Por esta razón, las imágenes se procesan inicialmente con un filtro mediana, pues permite reducir el ruido sin tener grandes pérdidas en los bordes.

Luego se realizó un estudio comparativo de la información en cada uno de los canales de color que componen la imagen, encontrando que el canal rojo, tal como ilustra la figura 3, entregaba la mejor separación de color entre el fondo y las células. Por lo cual se empleó este único canal para los pasos posteriores.

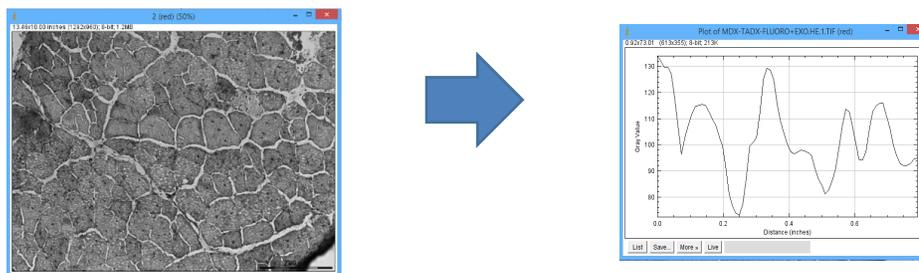


Figura 3. Canal rojo y perfil obtenido.

Con el fin de profundizar la separación entre las células, se empleó una erosión seguida de una dilatación morfológica, proceso conocido como apertura. Sin embargo, se encontró que la apertura logarítmica, permite obtener resultados más uniformes en toda la imagen, independiente de la intensidad de la tinción, tal como se observa en la figura 4.

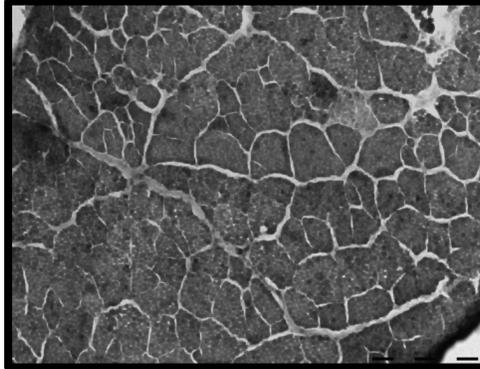


Figura 4. Resultado obtenido con la morfología logarítmica. Obsérvese cómo se obtiene una mejor separación entre las células.

Una vez mejorada la separación entre células se emplea un método de detección de bordes, siendo los más populares los operadores de Sobel y Feldman, y el método de Canny. Sin embargo, estas técnicas obtienen bordes abiertos. Así, la última etapa consiste en el cerramiento de contornos, en la cual se emplea como información la dirección del contorno para buscar entre los píxeles vecinos, el siguiente de contorno.

Conclusiones

En este artículo se ha presentado un nuevo método para la detección de células de fibras musculares en imágenes de microscopía. Esta técnica, aún en desarrollo, facilita el trabajo del especialista, permitiendo una mejor detección de los bordes, en mucho menor tiempo y con mayor precisión. Este trabajo espera ser un paso hacia adelante en el desarrollo de este tipo de técnicas en el estudio de fibras musculares.

Sobre los autores

- **Manuel Guillermo Forero Vargas:** Ing. electrónico. Magister en Ing. Eléctrica. Área: Bioingeniería. Master en imágenes médicas y Doctor en Ing. Biomédica. Decano Facultad de Ingeniería, Universidad de Ibagué. Director del semillero en procesamiento de imágenes y reconocimiento de patrones Lún. manuel.forero@unibague.edu.co.
- **Diego Alejandro Urrego Gamboa:** Estudiante de Ingeniería electrónica, Universidad de Ibagué. Miembro del Semillero Lún. 2420131022@estudiantesunibague.edu.co.
- **Jorge Danilo Español Díaz:** Estudiante de Ingeniería electrónica, Universidad de Ibagué. Miembro del Semillero Lún. Miembro del Semillero Lún. 2420131029@estudiantesunibague.edu.co.

Los puntos de vista expresados en este artículo no reflejan necesariamente la opinión de la Asociación Colombiana de Facultades de Ingeniería.

Copyright © 2019 Asociación Colombiana de Facultades de Ingeniería (ACOFI)